图 1、2 半栏，65 高；图 3 通栏，135 高；图 4 通栏，155 高

斑地锦 RT-qPCR 内参基因的筛选

宋美玲[1]，黄胜和[1*]，陈祖杰[2]，邹嘉轩[3]，刘欢胜[3]，全文军[3]
（1. 江西中医药高等专科学校 医学基础部，江西 抚州 344000；2. 南昌大学 江西医学院，南昌 330031；3. 南昌大学 抚州医学院，江西 抚州 344000）

摘要：实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）的前提条件之一是具有合适的内参基因。为筛选斑地锦（*Euphorbia maculata* L.）合适的不同生长期不同组织 RT-qPCR 内参基因，利用同源克隆法克隆斑地锦 *GAPDH*、*EF-1α*、*act*、*UBQ*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 等基因片段，RT-qPCR 检测 7 个候选内参基因在斑地锦不同生长期根、茎、叶和果实中的表达情况，geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等生物学软件对各候选基因表达稳定性进行评价。结果显示：克隆的 *GAPDH*、*EF-1α*、*act*、*UBQ*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 基因片段为 729、808、753、422、233、656、313 bp，分别编码 242、269、250、140、77、218、103 个氨基酸，与其他植物相应氨基酸序列的最高同源性均在 85%以上。综合 3 个分析软件对各生长期不同组织中表达稳定性进行的评价得出，表达稳定性排名为 *UBQ*>*EF-1α*>*TUB-α*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*CYP*>*act*。因此，可以选取 *UBQ* 作为斑地锦 RT-qPCR 分析的内参基因，用于不同生长期基因组织特异性表达研究。

关键词：斑地锦，基因克隆，内参基因，RT-qPCR

中图分类号：R286.12　　**文献标识码：**A

Screening of reference genes for RT-qPCR in *Euphorbia maculata*

SONG Meiling[1], HUANG Shenghe[1*], CHEN Zujie[2], ZOU Jiaxuan[3], LIU Huansheng[3], QUAN Wenjun[3]
(1. *Department of Basic Medicine*, *JiangXi College of Traditional Chinese Medicine*, Fuzhou 344000, Jiangxi, China; 2. *Jiangxi Medical College*, *Nanchang University*, Nanchang 330031, China; 3. *Fuzhou Medical College*, *Nanchang University*, Fuzhou 344000, Jiangxi, China)

Abstract: The suitable reference genes is a prerequisite for real-time quantitative PCR (RT-qPCR). In order to provide a suitable reference gene for gene expression analysis using RT-qPCR in *Euphorbia maculata*, the *GAPDH*, *EF-1α*, *act*, *UBQ*, *TUB-α*, *eIF-4A,* and *CYP* gene fragments were cloned with the method of homologous cloning. Subsequently, the expression patterns of the seven candidate reference genes were obtained by RT-qPCR in *E. maculata,* and the expression stability was assessed by geNorm, NormFinder, and BestKeeper. The results suggested that the fragment sequences of *GAPDH*, *EF-1α*, *act*, *UBQ*, *TUB-α*, *eIF-4A* and *CYP* contained 729 bp (encoding 242 amino acids), 808 bp (encoding 269 amino acids), 753 bp (encoding 250 amino acids), 422 bp (encoding 140 amino acids), 233 bp (encoding 77 amino acids), 656 bp (encoding 218 amino acids), and 313 bp (encoding 103 amino acids), respectively. And the seven amino acid sequences shared over 85% identity with other *GAPDH*, *EF-1α*, *act*, *UBQ*, *TUB-α*, *eIF-4A*, *CYP*

收稿日期：2021-04-19

基金项目：江西省教育厅科学技术研究项目（GJJ191230）[Supported by Scientific and Technological Research Program of Jiangxi Education Department (GJJ191230)]。

作者简介：宋美玲（1989- ），硕士，讲师，主要从事药用植物生物技术研究，（E-mail）sml0703@163.com。

***通信作者：**黄胜和，博士，副教授，主要从事药用植物生物技术研究，（E-mail）hsh712@163.com。

by Blastp in GenBank. On the other hand, the order of expression stability was *UBQ*>*EF-1α*>*TUB-α*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*CYP*>*act* by GeNorm, NormFinder, and BestKeeper. Therefore, *UBQ* could be selected as a reference gene for RT-qPCR in *E. maculata* using for gene expression analysis in various plant tissues at different growth stages.

Keywords: *Euphorbia maculata*；gene cloning；reference genes；RT-qPCR

地锦草药材为大戟科大戟属一年生草本植物地锦（*Euphorbia humifusa*）或斑地锦（*E. maculata*）的干燥全草，又名鬼见愁、血筋草、奶汁草等，分布于中国江苏、江西、浙江、湖北、河南、河北、新疆和内蒙古等地（中国科学院中国植物志编辑委员会，1997），是中医、维医、蒙医常用药材，具有清热解毒，凉血止血，利湿退黄等功效，主治痢疾、泄泻、咯血、尿血、便血、崩漏、疮疖痈肿、湿热黄疸等（国家药典委员会，2015），目前已开发有肠炎宁片、三七止血片、泻痢宁片等中成药。斑地锦主要含有黄酮类、萜类、酚酸类和生物碱类等成分，具有抗氧化、抗炎、抗菌、止血、免疫调节等作用（柳润辉等，2001；安惠霞等，2008）。目前，斑地锦研究多聚焦在质量标准控制、药理学作用、化学成分的提取及鉴定等方面（Tian et al., 2019；胡建新等，2018），分子生物学相关研究少见报道。

实时荧光定量 PCR 是在普通 PCR 的基础上引入荧光基团，通过相应的荧光信号积聚实时监测整个反应的进程，为未知序列进行定量分析的方法，其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确（Wang et al., 2019；张玉芳等，2014），已经成为分子生物学中研究基因表达的重要工具之一，而使用合适的内参基因是获得可信定量结果的前提（Shakeel et al., 2018）。在实际应用中，RNA 提取、cDNA 合成及 PCR 扩增效率等因素会直接影响实验结果，因此常用表达稳定的内参基因进行校正和标准化（Bustin, 2002），以减少样品之间和样品内部的误差。近来的研究表明，内参基因不存在绝对通用性，若不经筛选而以一种基因作为任何条件下的内参，得到的结果精确度大大降低，甚至是错误的（Zhu et al., 2019）。另外，单一传统的内参基因有时会对结果精确性产生影响，新内参基因将逐渐取代某些表达稳定性差的传统管家基因（Nguyen et al., 2018），或应用内参基因组合有效地减少基因表达误差（袁伟等，2012），以获得更准确的分析结果。同时，基于基因芯片技术和基因表达数据库的筛选（Liang et al., 2018），也将有助于获得更可靠的内参基因。因此，在分析目标基因表达之前，有必要对候选内参基因进行筛选与评估，而评价内参基因表达稳定性的软件较多，其中 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 是应用较广泛的（Kiarash et al., 2018；Zhong et al., 2019）。目前常用的内参基因有 *act*（actin）、*GAPDH*（glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase）、*EF-1α*（elongation factor-1 alpha）、*UBQ*（ubiquitin）、*TUB-α*（tubulin alpha）、*eIF-4A*（eukaryotic translation initiation factor 4A）、*CYP*（cyclophilin）、*18S rRNA*（18S ribosomal RNA）等（Haller et al., 2004；Kozera ＆ Rapacz, 2013）。为筛选斑地锦合适的不同生长期不同组织 RT-qPCR 内参基因，本研究同源克隆斑地锦 *GAPDH*、*EF-1α*、*act*、*UBQ*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 等 7 个候选内参基因片段，RT-qPCR 检测在斑地锦不同生长期（苗期、花期、果期）根、茎、叶和果实中的表达情况，利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等软件对各候选基因表达稳定性进行评价，为斑地锦不同生长期基因组织特异性表达研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斑地锦种子由江西天施康生态中药种植有限公司惠赠，种植于南昌大学抚州医学院实验田，经江西中医药高等专科学校药学系中药教研室鉴定为斑地锦。分别采集种植 70 d 后的苗期（未开花）、花期（开 3 朵以上的花且未结果）的根、茎、叶，以及果期（结 3 个以上的果）的根、茎、叶、果，每个样品皆为 3 株以上的混合样品，采集后立即置-80 ℃冰箱备用。

1.2 主要试剂与仪器

植物总 RNA 提取试剂盒（Spin Column Plant Total RNA Purification Kit）、胶回收试剂盒（SanPrep Column DNA Gel Extraction Kit）、引物合成、测序等，生工生物工程(上海)股份有限公司；反转录试剂盒（PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser）、荧光定量 PCR 试剂（PrimeScript™ RT Master Mix）等，宝生物工程（大连）有限公司；Pfu 酶（TransStart® FastPfu DNA Polymerase），Taq 酶，T-载体（*pEASY*®-Blunt Simple Cloning Kit），北京全式金生物技术有限公司。

普通 PCR 仪（T100™ Thermal Cycler）、荧光定量 PCR 仪（CFX96 Real-Time）等，美国 Bio-Rad 公司。超微量分光光度计（NanoDrop One），美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

斑地锦不同生长期根、茎、叶、果实总 RNA 的提取和 cDNA 的合成皆参照试剂盒说明书操作。总 RNA 提取后通过琼脂凝胶电泳检测 RNA 的质量，并用超微量分光光度计测定 RNA 浓度，以保证后续实验的进行。

1.3.2 引物设计

在 GenBank 中查询相关序列，尤其是同科植物蓖麻（*Ricinus communis*）、麻疯树（*Jatrophacurcas*）和橡胶树（*Hevea brasiliensis*）等的 *GAPDH*、*EF-1α*、*act*、*UBQ*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 的基因序列，比对找出高度保守区段，分别设计克隆斑地锦相关基因的简并引物。后续根据测序结果，利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 RT-qPCR 引物。本实验所用引物见表 1。

表 1 基因片段克隆引物和 qPCR 引物

Table 1 Cloning and qPCR primer sequences for candidate reference genes

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′ →3′)	退火温度 Annealing temperature (℃)	片段长度 Fragment length (bp)	备注 Remark
GAPDH-F	MGTTCATGGTCAVTGGAAGC	56	730	克隆基因片段 Cloning for Gene fragment
GAPDH-R	CAATTCCWGCCTTGGCATC			
EF-1α-F	YTGYTGYAACAAGATGGATGC	56	805	克隆基因片段 Cloning for Gene fragment
EF-1α-R	GATCCTTCTTCTCAACACTCTT			
act-F	CTGGATTTGCTGGAGATGATG	57	750	克隆基因片段 Cloning for Gene fragment
act-R	ATTTCATGATGGAGTTGTAAGTGG			
UBQ-F	ATGCAGATCTTYGTGAARACCCT	57	420	克隆基因片段 Cloning for Gene fragment
UBQ-R	CAGTAGTGGCGRTCGAAGTGGT			
TUB-α-F	TGARCCHTCDTCYATGATGG	51	240	克隆基因片段 Cloning for Gene fragment
TUB-α-R	CAHACAGCYCTYTGMACCTT			
eIF-4A-F	GAGCTDGCHCAGCARATTGAGAARGT	58	650	克隆基因片段 Cloning for Gene fragment
eIF-4A-F	AGDGARACYTGYTGVACRTCRATACC			

CYP-F	GAGAACTTCMGGGCNCTC	53	310	克隆基因片段
CYP-R	CTGSCCGAACACGACG			Cloning for Gene fragment
$Oligo(dT)_{18}$	TTTTTTTTTTTTTTTTTT			cDNA 合成 synthesis of cDNA
GAPDH-qF	TGATCTCACAGTCAGGCTCG	55	147	RT-qPCR
GAPDH-qR	TGACCTGCTGTCGCCAAC			
EF-1α-qF	CCTCCCACATTGCTGTCAAG	55	167	RT-qPCR
EF-1α-qR	ATGGAGGGTACTCAGAGAAGG			
act-qF	CCACTGGTATTGTTCTGGAC	53	169	RT-qPCR
act-qR	TGCGGTTGTGGTGAAAGAGT			
UBQ-qF	ATAACCCTCGAGGTCGAGTC	53	166	RT-qPCR
UBQ-qR	TGGAGAGTGGACTCCTTCTG			
TUB-α-qF	TGCCTCATGTACCGTGGTG	55	178	RT-qPCR
TUB-α-qR	ACAGCTCTTTGAACCTTGGC			
eIF-4A-qF	TCTTCCAGTTGCTACCAACC	53	189	RT-qPCR
eIF-4A-qF	GTCTCGAGCTTCCACTCTTC			
CYP-qF	AAGCCTCTCCACTACAAAGG	53	162	RT-qPCR
CYP-qR	GAATTCCAGGACCGGTGTG			

1.3.3 候选内参基因片段的克隆与分析

PCR 反应体系（25 μL）：5×GC Buffer 5 μL，dNTPs（各 2.5 mmol • L^{-1}）2.5 μL，简并引物 F（10 μmol • L^{-1}）、R（10 μmol • L^{-1}）各 1 μL，cDNA 模板 1 μL，Pfu 酶（5 U • $μL^{-1}$）0.3 μL，灭菌 ddH_2O 14.2 μL。扩增条件：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，相应退火温度 30 s，72 ℃ 60 s，30 个循环；72 ℃ 5 min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测，目的片段的回收纯化按照试剂盒操作说明进行。将回收的 DNA 片段连接 T-载体后转化大肠杆菌 DH5α，菌液 PCR 鉴定阳性克隆，送测序。所得序列在 GenBank 中进行 Blast 比对。

1.3.4 RT-qPCR 引物检测与熔解曲线分析

为检验引物特异性，排除引物二聚体及非特异性扩增产物对结果的影响，用相应引物 qF、qR 进行普通 PCR，然后进行 RT-qPCR，再加热 RT-qPCR 产物从 65 ℃到 95 ℃，每隔 0.5 ℃停留 5 s 检测 1 次荧光强度以获取熔解曲线。RT-qPCR 反应体系(20 μL)：2×SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL，引物 qF（10 μmol • L^{-1}）、qR（10 μmol • L^{-1}）各 0.4 μL，cDNA 模板 2 μL，灭菌 ddH_2O 7.2 μL；扩增条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s，相应退火温度 30 s，72 ℃ 30 s，40 个循环。

1.3.5 候选内参基因的筛选

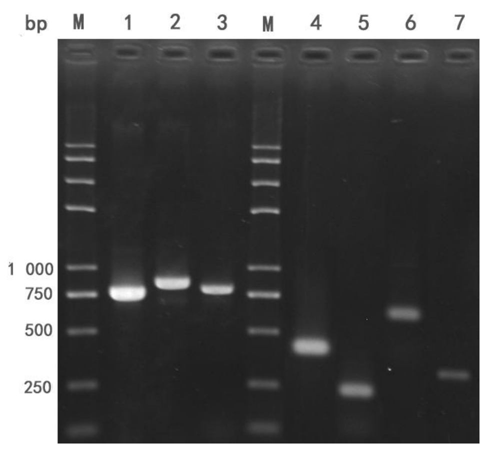
分别将样品总 RNA 的反转录产物 cDNA 作为模板，进行 RT-qPCR 扩增，geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对 3 个候选内参基因表达稳定性进行评估。将 Ct 值转化为相对表达量(吴建阳等，2017)，按照公式 $Q=2^{(Ct\ \min\ -\ Ct\ \text{sample})}$进行转化，用于 geNorm 和 NormFinder 软件分析，BestKeeper 软件直接输入 Ct 值进行分析，最后进行综合排名，得出最适合斑地锦不同生长期基因组织特异性表达研究的内参基因。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因片段的克隆与分析

以总 RNA 反转录所得到的 cDNA 为模板，相应简并性引物 F、R 为引物进行 PCR 扩增，

扩增产物大小符合预期（图 1）。对其测序后显示，克隆的 *GAPDH*、*EF-1α*、*act*、*UBQ*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 基因片段为 729、808、753、422、233、656、313 bp，分别编码 242、269、250、140、77、218、103 个氨基酸。将氨基酸序列在 GenBank 中 Blastp 后，GAPDH、EF-1α、act、UBQ、TUB-α、eIF-4A、CYP 分别与莴苣 GAPDH（XP023733724）、蓖麻 EF-1α（XP002518073）、荔枝 act（ADV17460）、山梨猕猴桃 UBQ（GFZ13847.1）、大麦 TUB-α（CAB76917.1）、玉米 eIF-4A（U17979.1）、油桐 CYP（ARV78452.1）的同源性为 95%、99%、100%、99%、99%、87%、86%。将相应核苷酸序列登录到 GenBank，获得登录号 *EmGAPDH*（MT044466）、*EmEF-1α*（MT044465）、*Emactin*（MT044464）、*EmUBQ*（MW815120）、*EmeIF-4*A（MW815119）、*EmTUB-α*（MW815118）、*EmCYP*（MW815117）。



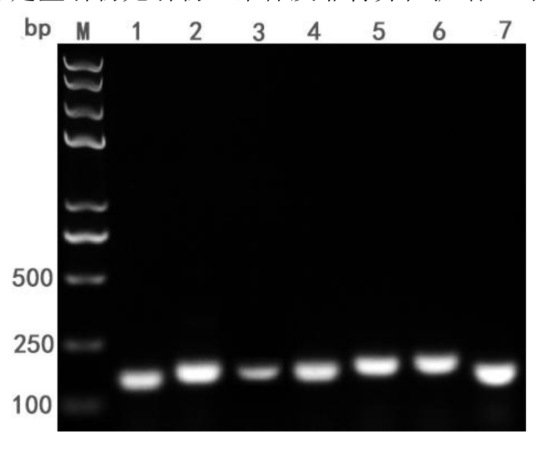
M. Marker；1. *GAPDH*；2. *EF-1α*；3. *act*；4. *UBQ*；5. *TUB-α*；6. *eIF-4A*；7. *CYP*.

图 1 克隆引物 PCR 扩增候选基因的结果

Fig. 1 PCR products of candidate reference genes using primers, F and R

2.2 RT-qPCR 引物检测与熔解曲线分析

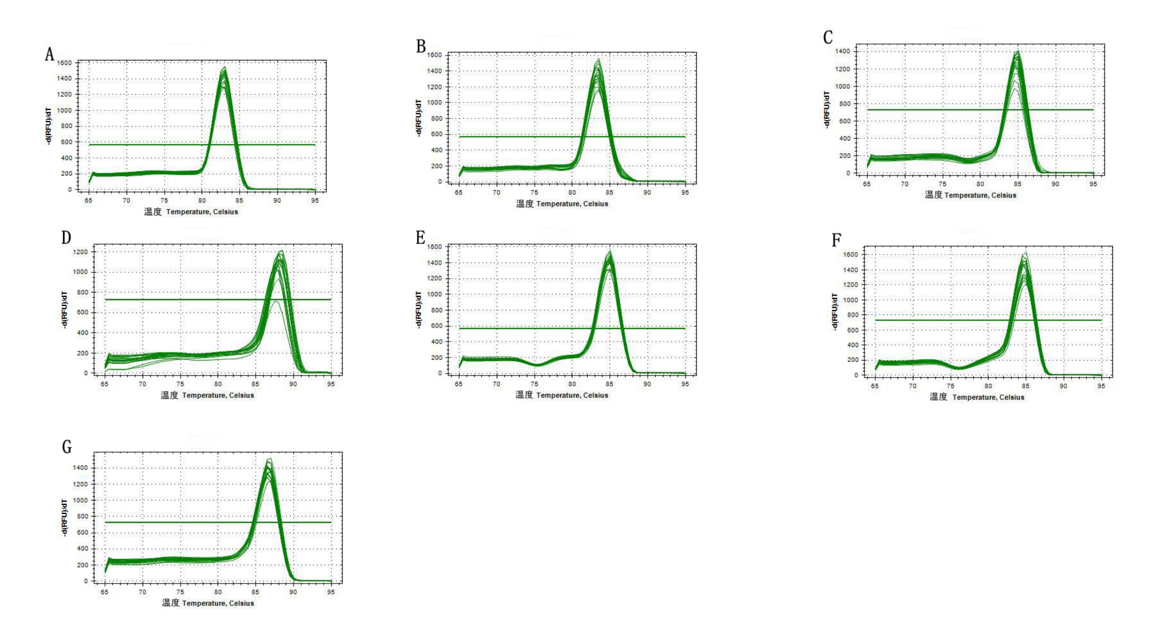
用相应引物 qF、qR 进行普通 PCR 扩增，产物长度与预期一致（图 2）。将荧光定量 RT-PCR 产物进行熔解曲线分析，各基因引物的熔解曲线均显示单峰（图 3）。以上结果表明，本实验所设计定量引物无引物二聚体及非特异性扩增，可用于后续的 RT-qPCR 分析。



M. Marker；1. *GAPDH*；2. *EF-1α*；3. *act*；4. *UBQ*；5. *TUB-α*；6. *eIF-4A*；7. *CYP*.

图 2 克隆引物 PCR 扩增候选基因的结果

Fig. 2 PCR products of candidate reference genes using primers, qF and qR



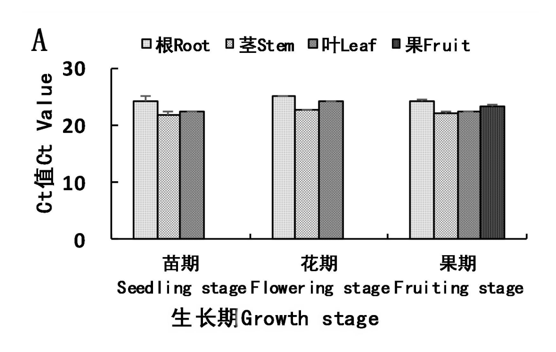
A. *GAPDH*; B. *EF-1α*; C. *act*; D. *UBQ*; E. *TUB-α*; F. *eIF-4A*; G. *CYP*.

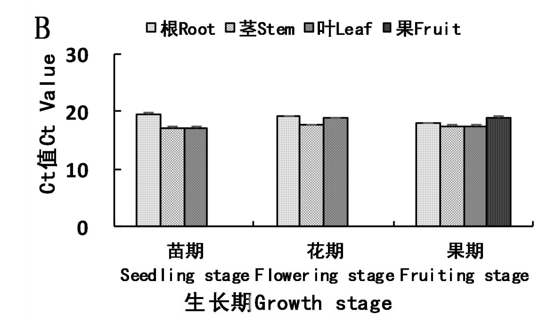
图 3 候选基因熔解曲线

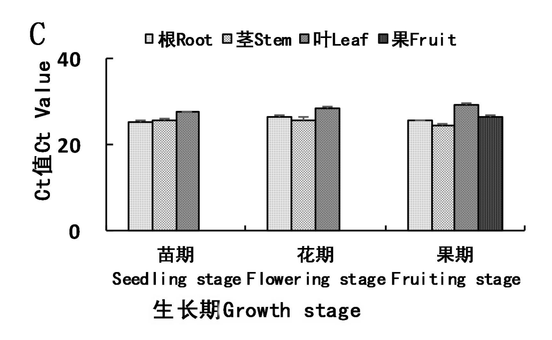
Fig. 3 Melting curves of candidate reference genes

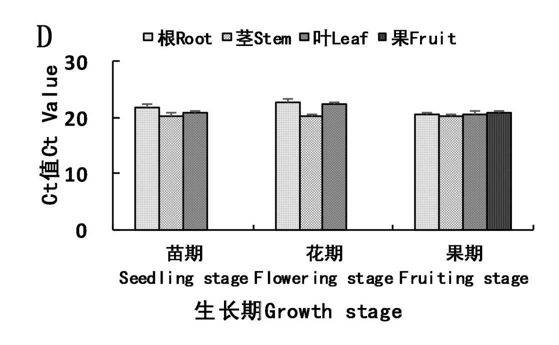
2.3 候选内参基因的 Ct 值分析

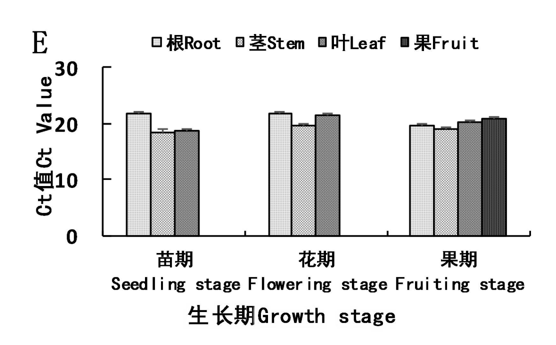
对斑地锦不同生长期各组织（根、茎、叶和果）的 cDNA 样品进行 RT-qPCR 扩增，运用 Ct 值评估各内参基因的表达量，Ct 值与其表达量成反比，即 Ct 值越小，表达量越高。内参基因的表达值排序为：*EF-1α*>*TUB-α*>*eIF-4A*>*UBQ*>*CYP*>*GAPDH*>*act*，Ct 值分别为 17.04～19.55、18.52～21.81、18.58～22.04、20.19～22.90、20.63～24.99、21.85～24.95、24.44～29.26（图 4）。3 次重复之间各内参基因的表达量变动较小，且表达量都不是恒定不变的。

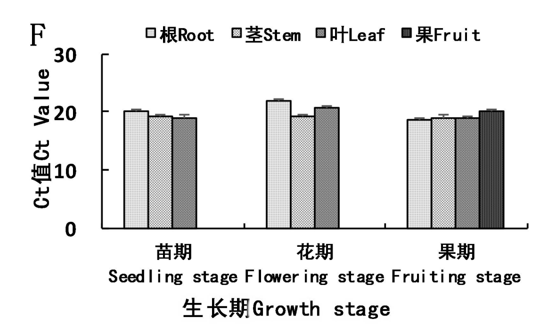


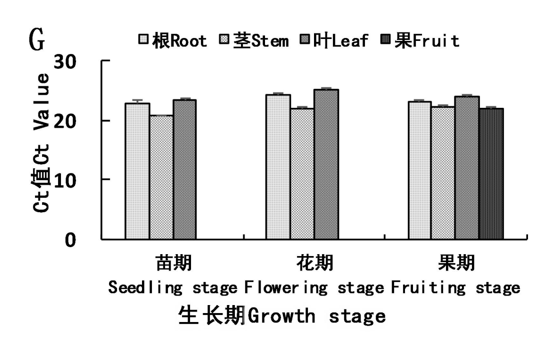












A. *GAPDH*; B. *EF-1α*; C. *act*; D. *UBQ*; E. *TUB-α*; F. *eIF-4A*; G. *CYP*.

图 4 内参基因在各生长期不同组织样品中的 RT-qPCR Ct 值

Fig. 4 Ct values of RT-qPCR for candidate reference genes in various tissues at different growth stages

2.4 候选内参基因表达稳定性分析

2.4.1 geNorm 软件分析

geNorm 软件通过计算稳定系数 M 来分析基因表达稳定性，M 值越小，稳定性越好。7 个候选内参基因除了 *act* 外在不同组织中表达的 M 值都小于 1.5，稳定性排名为 *UBQ*>*TUB-α*>*EF-1α*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*CYP*>*act*（表 2）。

表 2 geNorm 分析内参基因在各生长期不同组织中的表达稳定性

Table 2 The expression stability of candidate reference genes analyzed by geNorm

基因 Gene	M 值 M value	排名 Rank
UBQ	0.824	1
TUB-α	0.899	2
EF-1α	0.915	3
eIF-4A	0.944	4
GAPDH	0.955	5
CYP	1.165	6
act	1.649	7

2.4.2 NormFinder 软件分析

与 geNorm 类似，NormFinder 软件也是基于各候选内参基因的 M 值，通过方差评估其表达稳定性。经 NormFinder 软件分析，7 个内参基因在各组织中的表达稳定程度存在差异，按 M 值大小排序为 *UBQ*>*TUB-α*>*EF-1α*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*CYP*>*act*（表 3）。*UBQ* 的 M 值最低，总体稳定性最好。

表 3 NormFinder 分析内参基因在各生长期不同组织中的表达稳定性

Table 3 Expression stability of candidate reference genes analyzed by NormFinder

基因 Gene	M 值 M value	排名 Rank
UBQ	0.190	1
TUB-α	0.347	2
EF-1α	0.419	3
eIF-4A	0.427	4
GAPDH	0.443	5
CYP	0.588	6
act	1.075	7

2.4.3 Bestkeeper 软件分析

BestKeeper 直接根据各基因的 Ct 值，计算标准偏差（standard devialion，SD）和和变异系数（coefficient of variation，CV）来评估各内参基因的稳定性。一般来说，稳定的内参基因具有较小的 SD 值和 CV 值。BestKeeper 分析的基因表达稳定性排名为：*EF-1α*>*UBQ*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*TUB-α*>*CYP*>*act*（表 4）。其中，*EF-1α*、*UBQ*、*eIF-4A* 的 SD 值和 CV 值比较相近，表达都相对稳定。

表 4 BestKeeper 分析内参基因在各生长期不同组织中的表达稳定性

Table 4 The expression stability of candidate reference genes analyzed by BestKeeper

基因 Gene	SD 值 SD value	CV 值 CV value	排名 Rank
EF-1α	0.79	4.36	1
UBQ	0.80	3.81	2
eIF-4A	0.81	4.10	3
GAPDH	0.98	4.23	4
TUB-α	1.01	5.02	5
CYP	1.05	4.56	6
act	1.16	4.40	7

2.4.4 综合分析

由于各内参基因在 3 个软件中的排序略有差异，故运用几何平均值算法进行各候选内参基因的综合排名，内参基因几何平均值越低，则其稳定性越好。各内参基因在斑地锦不同生长期的不同组织中表达稳定性综合排名为 *UBQ*>*EF-1α*>*TUB-α*>*eIF-4A*>*GAPDH*>*CYP*>*act*（表 5）。

表 5 各内参基因在各生长期不同组织中表达稳定性综合排名

Table 5 The overall ranking of expression stability of candidate reference genes

基因 Gene	GeNorm	NormFinder	Bestkeeper	几何平均值 Geometrical mean	综合排名 Comprehensive rank
UBQ	1	1	2	1.33	1
EF-1α	3	3	1	2.33	2
TUB-α	2	2	5	3.00	3
eIF-4A	4	4	3	3.33	4
GAPDH	5	5	4	4.67	5
CYP	6	6	6	6.00	6
act	7	7	7	7.00	7

3 讨论与结论

地锦草是中医、维医、蒙医常用药材，主要含有黄酮类、萜类、酚酸类和生物碱类等，其中槲皮素含量作为其质量标准，目前，斑地锦的分子生物学相关研究少见报道。本研究首次克隆了斑地锦 *GAPDH*、*EF-1α*、*act*、*UBQ*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 等常用的传统内参基因片段，并作为候选内参基因进行 RT-qPCR，分别用 geNorm、NormFinder 和 Bestkeeper 评价在各生长期（苗期、花期、果期）根、茎、叶和果实中的表达稳定性。本实验中，各候选内参基因在不同生长期各组织中的表达丰度除 *act* 外都较高，Ct 值皆在 25 以下，符合要求。由于 3 个评估软件采用不同统计学算法，分析结果通常存在差异，需要综合分析得到最适合的内参基因（Kiarash et al., 2018；Zhong et al., 2019），其中 geNorm 和 NormFinder 的分析结果较为一致，*UBQ*、*TUB-α*、*EF-1α*、*eIF-4A*、*GAPDH* 的 M 值都<1，比较稳定，但最佳内参基因为 *UBQ*，而 Bestkeeper 评价结果与前二者略有差异，*EF-1α*、*UBQ*、*eIF-4A*、*GAPDH*

的 SD 值<1，该软件筛选的最优内参基因为 *EF-1α*，而 *UBQ* 和 *eIF-4A* 表达也比较稳定，与 *EF-1α*没有明显差异。UBQ 是泛素蛋白，与蛋白质调节系统有关，参与细胞代谢过程，是常用的内参基因，在许多植物中得到应用，例如分析芍药花瓣不同发育时期和不同组织的基因表达时可选用 *UBQ* 作为内参基因（李健，2017）。*EF-1α*是转录延伸因子α亚基基因，在真核生物中参与转录控制、凋亡以及信号转导等一系列重要的生命活动过程，也是较为常用的内参基因，在朱顶红不同组织中表达较稳定（刘晓婷等，2018）。*GAPDH*、*act*、*TUB-α*、*eIF-4A*、*CYP* 等不是斑地锦各生长期不同组织 RT-qPCR 的合适内参基因，但在其他一些植物中可能稳定表达，这也证明在不同植物或不同实验条件下进行 RT-qPCR 有必要对内参基因进行筛选与评估(Kozera ＆ Rapacz, 2013）。因此，若研究斑地锦不同生长期基因组织特异性表达时，可以选取 *UBQ* 作为内参基因，如果选择内参基因组合，则 *UBQ* 和 *EF-1α*较为合适。此结果为后续斑地锦分子生物学相关研究提供了便利条件。当然，随着斑地锦基因发掘和表达研究的深入，不排除会出现更稳定的内参基因。

参考文献:

AN HX, LI ZJ, GULINA D, et al., 2008. Research advance of the uighur medicine dijincao[J]. Lishizhen Med MatMed Res, 19(12): 2866-2868. [安惠霞，李治建，古丽娜·达吾提，等，2008. 地锦草的研究进展[J]. 时珍国医国药，19（12）：2866-2868.]

BUSTIN S, 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR: trends and problems[J]. J Mol Endocrinol, 29(1): 23-29.

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Vol. I) [M]. Beijing: China Medical Science Press:127. [国家药典委员会，2015. 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社：127.]

Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita, 1997. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (Vol. 3) [M]. Beijing: Science Press, 44:49-50. [中国科学院中国植物志编辑委员会，1997. 中国植物志(第三分册) [M]. 北京：科学出版社，44：49-50.]

HALLER F, KULLE B, SCHWAGER S, et al., 2004. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase suitable for normalization chain reaction: Confirmation of reference genes[J]. Anal Biochem, 335(1): 1-9.

HU JX, XI XT, WANG XM, et al., 2018. Mechanism of *Humifuse euphorbia* in regulating tumor angiogenesis by NF-κB/VEGF signal pathway[J]. Chin J Exp Trad Med Form. 24(20): 167-172. [胡建新，席晓甜，王晓敏，等，2018. 地锦草调控 NF-κB/VEGF 信号通路抑制肿瘤血管生成的机制[J]. 中国实验方剂学杂志，24（20）：167-172.]

KIARASH JG, WILDE HD, AMIRMAHANI F, et al., 2018. Selection and validation of reference genes for normalization of RT-qPCR gene expression in wheat (*Triticum durum* L.) under drought and salt stresses[J]. J Genet, 97(5): 1433-1444.

KOZERA B, RAPACZ M, 2013. Reference genes in real-time PCR[J]. J Appl Genet, 54(4): 391-406.

LI J, 2017. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time pcr in herbaceous peony[J]. Mol P Breed, 15(7): 2544-2549. [李健，2017. 芍药实时定量 PCR 内参基因的筛选和验证[J]. 分子植物育种，15（7）：2544-2549.]

LIANG WX, ZOU XX, CARBALLAR-LEJARAZU R, et al., 2018. Selection and evaluation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Euscaphiskonishii* Hayata based on transcriptome data[J]. Plant Methods, 14(1): 42.

LIU RH, WANG HB, KONG LY, 2001. Studies on chemical constituents of *Euphorbia humifusa*[J]. Chin Traditional Herbal Drugs, 32(2): 107-108. [柳润辉，王汉波，孔令义，2001.

地锦草化学成分的研究[J]. 中草药，32（2）：107-108.]

LIU XT, WANG SL, XUE JQ, et al., 2018. Selection of reference genes for quantitative real-Time PCR in different tissue and organ of barbadoslily[J]. Acta Hortic Sin, 45(5): 919-930. [刘晓婷，王顺利，薛璟祺，等，2018. 朱顶红实时荧光定量 PCR 中不同组织器官内参基因的筛选[J]. 园艺学报，45（5）：919-930.]

NGUYEN N, SUOKAS M, KARPPINEN K, et al., 2018. Recognition of candidate transcription factors related to bilberry fruit ripening by de novo transcriptome and RT-qPCR analyses[J]. Sci Rep, 8(1): 1-12.

SHAKEEL M, RODRIGUEZ A, TAHIR UB, et al., 2018. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects[J]. Biotechnol Lett, 40(2): 227-236.

TIAN S, WEN E, MI N, et al., 2019. Determination of three active components in *Euphorbia humifusa* will. U dsing high-performance liquid chromatography with diode-array detection and autophagy and apoptosis analysis of normal rat kidney and HeLa cells[J]. Pharmacogn Mag, 15(61): 348.

WANG Y, DAI M, CAI D, et al., 2019. Screening for quantitative real-time PCR reference genes with high stable expression using the mRNA-sequencing data for pear[J]. Tree Genet Genomes, 15(4): 54.

WU JY, HE B, DU YJ, et al., 2017. Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm,NormFinder and BestKeeper[J]. Mod Agri Sci Tech, (5): 278-281. [吴建阳，何冰，杜玉洁，等，2017. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法[J]. 现代农业科技，（5）：278-281.]

YUAN W, WAN HJ, YANG YJ, 2012. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants[J]. Chin Bull Bot, 47(4): 427-436. [袁伟，万红建，杨悦俭，2012. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择[J]. 植物学报，47（4）：427-436.]

ZHANG YF, ZHAO LJ, ZENG YL, 2014. Selection and application of reference genes for gene expression studies[J].Plant Physiol J, 50(8): 1119-1125. [张玉芳，赵丽娟，曾幼玲，2014. 基因表达研究中内参基因的选择与应用[J]. 植物生理学报，50（8）：1119-1125.]

ZHONG S, ZHOU S, YANG S, et al., 2019. Identification of internal control genes for circular RNAs[J]. Biotechnol Lett, 41(10): 1111-1119.

ZHU L, YANG C, YOU Y, et al., 2019. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in peel and flesh of six apple cultivars (*Malusdomestica*) at diverse stages of fruit development[J]. Sci Hortic, 244: 165-171.